

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2011

Autores

Luciano Viana CotaEng.-Agr., Fitopatologia.
Pesquisador da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG. Cx. P. 151.
CEP 35701-970,
lvcota@cnpmis.embrapa.br**Rodrigo Vêras da Costa**Eng.-Agr., Fitopatologia,
Pesquisador da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG,
veras@cnpmis.embrapa.br**Dagma Dionísia da Silva**Eng.-Agr., Fitopatologia.
Pesquisadora da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, Sete Lagoas, MG.
Cx. P. 151. CEP 35701-
970, dagma@cnpmis.
embrapa.br**Carlos Roberto Casela**Eng.-Agr., Fitopatologia.
Pesquisador Aposentado
Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG, Cx.
P. 151. CEP 35701-970,
caselacarlos@hotmail.com

Metodologia para inoculação de *Peronosclerospora sorghi* e avaliação da resistência ao míldio em plântulas de sorgo

O míldio do sorgo, causado pelo fungo *Peronosclerospora sorghi* (W. Weston & Uppal) C.G., é uma doença com ampla faixa de adaptação climática, sendo encontrada na África, Ásia, América do Norte e América do Sul. No Brasil, o míldio, inicialmente restrito aos estados da região Sul, encontra-se atualmente distribuído em praticamente todas as áreas de plantio da cultura (CASELA; FERREIRA, 2001). Plantas de sorgo infectadas com *P. sorghi* nos primeiros estádios de desenvolvimento são estéreis, o que resulta em elevadas perdas quando as condições são favoráveis ao aparecimento da doença (BARBOSA et al., 2006). Perdas superiores a 80% têm sido registradas em cultivares suscetíveis. O fungo *P. sorghi* tem sido relatado infectando sorgo, milho e hospedeiros selvagens.

O patógeno apresenta ciclo de reprodução sexuada e assexuada, podendo ser disseminado por oósporos em sementes ou em restos culturais, dispersos pelo vento, por conídios (esporângios que germinam apenas de forma direta) produzidos numa mesma estação de cultivo ou, ainda, por micélio em sementes e plantas (FREDERIKSEN, 1980). A produção de oósporos segue um padrão monocíclico, enquanto a produção de conídios pode seguir padrão policíclico. Ambas estruturas de reprodução podem causar infecção sistêmica. Os conídios de *P. sorghi* são produzidos em grandes quantidades e podem iniciar epidemias. Os oósporos se constituem numa estrutura de resistência do patógeno e também um mecanismo para transporte a longa distância (BOCK et al., 1996).

No sorgo, o míldio ocorre como infecção sistêmica e/ou localizada. A forma sistêmica é induzida quando o patógeno coloniza os tecidos meristemáticos foliares. Os sintomas sistêmicos se caracterizam por estrias verdes e cloróticas paralelas (Figura 1), indicando a presença dos oósporos formados entre os feixes fibrovasculares das folhas. Em condições de temperatura amena e ambiente úmido, a superfície abaxial da área clorótica foliar é coberta por uma camada branca, que consiste de esporângios e esporangioforos de *P. sorghi* (Figura 2). Em estádios avançados de infecção sistêmica, as folhas se rasgam pela ação do vento (Figura 3) e os oósporos são liberados, infestando o solo, onde sobrevivem na ausência do hospedeiro. A forma localizada da doença resulta da infecção das folhas por conídios, que causam lesões necróticas. A infecção localizada se caracteriza por manchas cloróticas, retangulares, limitadas pelas nervuras laterais que também podem apresentar crescimento pulverulento branco na superfície abaxial das folhas, em condições úmidas e frias (Figura 4) (BARBOSA et al., 2006; CASELA; FERREIRA, 2001; JEGER et al., 1998).

Foto: Luciano Viana Cota



Figura 1. Sintomas de míldio sistêmico caracterizado pela presença de estrias de coloração verdes e cloróticas paralelas, indicando a presença dos oósporos formados entre os feixes fibrovasculares das folhas.

Foto: Luciano Viana Cota



Figura 3. Folha de sorgo infectada com *P. sorghi* rasgada pela ação do vento.

Foto: Carlos Roberto Casela

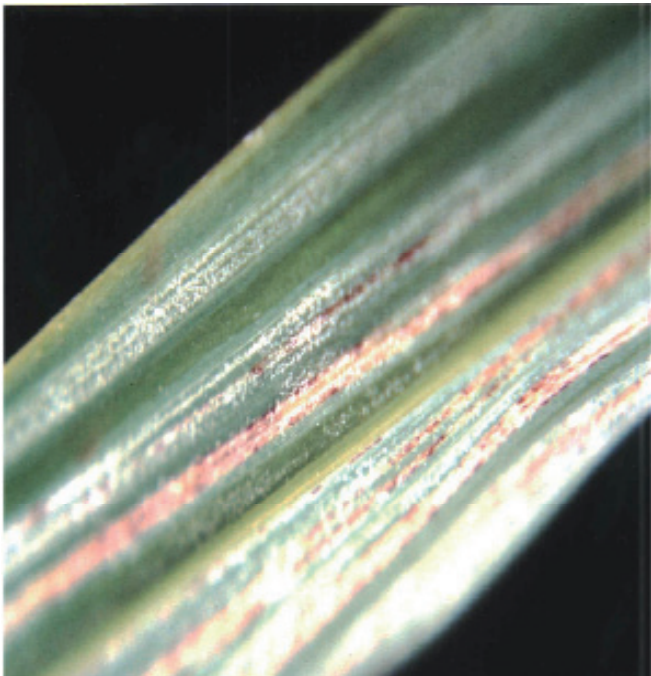


Figura 2. Esporulação (conídios e conidióforos) de *P. sorghi* na superfície abaxial de uma folha de sorgo infectada.

Foto: Carlos Roberto Casela



Figura 4. Sintomas foliar de infecção localizada de *P. sorghi* em sorgo.

As principais medidas recomendadas para o controle do míldio do sorgo são a utilização de cultivares resistentes e o tratamento das sementes com fungicidas. Fungicidas com princípio ativo metalaxil são eficientes no controle da doença (PINTO et al., 2004). No entanto, já existem relatos da ocorrência de populações de *P. sorghi*, com resistência ao metalaxyl (PERUMAL et al., 2006). Dessa forma, a busca por fontes de resistência ao míldio no germoplasma de sorgo, para uso em programas de melhoramento, deve ser contínua. Para tal, é fundamental o desenvolvimento e a padronização de metodologias que permitam a seleção segura dessas fontes de resistência e a determinação precisa da reação, de resistência ou de suscetibilidade, dos genótipos avaliados.

Considerando a inexistência de métodos padronizados para a inoculação e de avaliação da reação de genótipos de sorgo à infecção por *P. sorghi*, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método eficiente, rápido e prático para a inoculação deste patógeno em plântulas de sorgo. O método de inoculação foi baseado inicialmente em metodologia descrita na literatura (SINGH; GOPINATH, 1985; FERNANDES et al., 1984) e adaptado para uso na estrutura e no equipamento disponíveis no Cento Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo. No método original, há necessidade de se preparar a suspensão de inóculo e calibração no Laboratório e posterior inoculação. Na metodologia descrita, testou-se a possibilidade de se inocular as plântulas de sorgo com inóculo produzido diretamente nas folhas infectadas e depositá-los diretamente sobre as plântulas a serem inoculadas.

Para validação do método de inoculação, foram utilizados 19 híbridos experimentais de sorgo do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. Como padrão de suscetibilidade, foi utilizada a linhagem SC283. Os 20 genótipos foram inoculados com nove isolados de *P. sorghi*, conforme metodologia descrita a seguir.

Para a obtenção dos isolados, amostras de folhas com sintomas da doença foram coletadas

em campo e trazidas para o laboratório. As folhas com infecção sistêmica foram trituradas em liquidificador contendo 1L de água. O material triturado foi vertido em vasos de 5 Kg de solo esterilizado, na proporção de, aproximadamente, 100 ml do inóculo por vaso. A seguir, foi feita a semeadura do genótipo suscetível SC283, na proporção de 20 sementes por vaso. Foram semeados de 5 a 10 vasos por isolado. Cerca de 15 dias após a inoculação foram selecionadas as plantas com sintomas da doença, resultantes da infecção sistêmica, as quais foram desenvolvidas até o estágio de planta adulta e utilizadas para a realização das inoculações. Cada planta da cultivar suscetível com sintoma da doença foi considerada como o resultado da infecção por um único oósporo de *P. sorghi* e, portanto, como infectada por um único isolado do patógeno.

Para a inoculação de plântulas, sementes dos genótipos de sorgo foram colocadas para germinar em papel toalha umedecido, dentro de placas de Petri, e mantidas em câmara de incubação, do tipo BOD, a 32 °C durante 72 horas (Figura 5). Após o período de incubação, as sementes pré-germinadas (Figura 6) foram transferidas para copos plásticos de 100 ml, os quais foram mantidas em bandejas umedecidas durante seis dias (Figura 7). Ao final do sexto dia, foi adicionada água às bandejas, até cerca de 1/3 da altura dos copos plásticos, e as bandejas foram, então, cobertas com telas de nylon. Folhas da linhagem suscetível SC283, infectadas com os nove isolados, separadamente, e apresentando sintomas de infecção sistêmica, foram cortadas e fixadas sobre as telas de nylon, com a parte abaxial (com esporulação do fungo) voltada para baixo (figura 8). Os fragmentos de folhas foram, posteriormente, cobertos com três folhas de papel de germinação umedecidos e, acima destes, foi colocada uma lâmina de plástico (Figura 9). As bandejas preparadas foram levadas à câmara de incubação a temperatura de 18 °C durante 24 horas. Durante esse período, o inóculo produzido nas folhas infectadas foi liberado e disposto sobre as plântulas nos copos plásticos localizadas no interior das bandejas. No dia seguinte, as bandejas foram

abertas e mantidas em casa de vegetação durante 12 a 15 dias, até o aparecimento dos sintomas. As avaliações da reação (resistência ou suscetibilidade) dos genótipos foi realizada considerando-se a presença ou ausência dos sintomas (esporulação) nas folhas das plantas inoculadas.

Foto: Carlos Roberto Casela



Figura 5. Sementes de sorgo colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido e mantidas em câmara de crescimento tipo BOD.

Foto: Rodrigo Veras da Costa



Figura 7. Detalhe das plântulas de sorgo transplantadas para copos plásticos e mantidos em bandejas com água.

Foto: Rodrigo Veras da Costa

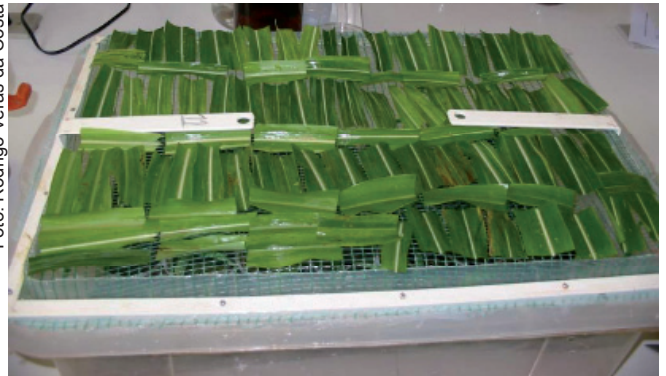


Figura 8. Detalhe da bandeja contendo os copos plásticos com as plântulas no seu interior, cobertas com uma tela de nylon, acima da qual foram dispostas as folhas apresentando sintomas de infecção sistêmica por *P. sorghi*.

Foto: Rodrigo Veras da Costa

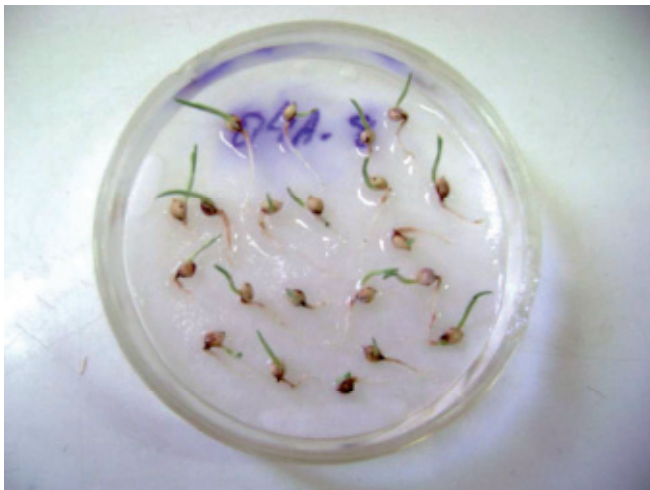


Figura 6. Sementes de sorgo pré-germinadas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido.

Foto: Carlos Roberto Casela



Figura 9. Bandeja preparada para a inoculação de *P. sorghi* em plântulas de sorgo. Detalhe da presença das folhas de papel de germinação umedecidas e lâmina de plástico fechando a bandeja.

Os resultados demonstraram uma elevada eficiência do método utilizado no processo de inoculação dos genótipos de sorgo e fenotipagem quanto à reação aos nove isolados de *P. sorghi*. Dentre os 19 híbridos avaliados, 11 apresentaram suscetibilidade a todos os nove isolados utilizados, à semelhança do observado na linhagem SC283, padrão de suscetibilidade (Tabela 1). Apenas o híbrido 9910032R x ATF54A apresentou resistência a todos os nove isolados. Como a linhagem ATF54A é reconhecida pela sua suscetibilidade aos isolados utilizados, é provável que a resistência desse híbrido tenha sido herdada da linhagem 9910032R, a qual constitui-se como uma importante fonte de resistência à *P. sorghi* para o programa de melhoramento. Os resultados observados para os híbridos 9910032R x ATF8A, 9910032R x ATF14A, 9910032R x CMSXS206A e 9910032R x 9409131A, confirmam o nível de resistência da linhagem 9910032R, os quais foram resistentes a 7, 6, 7 e 6 isolados, respectivamente. Os híbridos BR012R x ATF54A e BR012R x 9409131A, apresentaram reação de resistência a apenas um isolado.

Os resultados observados demonstraram que o método de inoculação avaliado foi eficiente e prático em reproduzir os sintomas do míldio em plântulas de sorgo em condição de casa de vegetação, evidenciando o seu potencial para uso em programas de melhoramento visando a fenotipagem de linhagens e híbridos e para a identificação de fontes de resistência ao míldio. Além da eficiência e praticidade do método, ele apresenta como grande vantagem a rapidez e o baixo custo para condução dos ensaios. Com 25 dias de inoculação já é possível obter a resposta do genótipo em relação à doença, permitindo a fenotipagem de um grande número de materiais. Com a metodologia desenvolvida não a necessidade de preparo e calibração da suspensão de inoculo conforme descrito por outros autores (SINGH; GOPINATH, 1985; FERNANDES et al., 1984), o inóculo foi utilizado diretamente das folhas doentes coletadas em casa de vegetação, o que facilita o processo de inoculação. Considerando ainda a existência de raças de *P. sorghi*, com o método pode-se realizar a inoculação de cada uma das raças, separadamente, e com pouca probabilidade de contaminação entre as parcelas experimentais.

Tabela 1. Reação de híbridos de sorgo a nove isolados de *Peronosclerospora sorghi*, inoculados em casa de vegetação.

Híbrido	Isolado de <i>Peronosclerospora sorghi</i>								
	4A	16A	18A	20A	22A	22B	20C	22C	22F
B012R x ATF8A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B012R x ATF14A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B012R x ATF54A	S	S	S	S	R	S	S	S	S
B012R x CMSXS206	S	S	S	S	S	S	S	S	S
BR012R x 9409131A	S	S	S	S	S	S	R	S	S
CMSXS180R x ATF8A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMSXS180R x ATF14A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMSXS180R x CMSXS206	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMSXS180R x 9409131A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMSXS182R x ATF8A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMSXS182R x ATF14A	R	R	R	S	R	R	S	R	R
CMSXS182R x ATF54A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMSXS182R x CMSXS206	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMSXS182R x 9409131A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9910032R x ATF8A	R	R	R	R	S	R	S	R	R
9910032R x ATF14A	R	R	R	R	R	R	S	S	S
9910032R x ATF54A	R	R	R	R	R	R	R	R	R
9910032R x CMSXS206	R	S	R	R	R	R	S	R	R
9910032R x 9409131A	R	R	R	R	S	S	R	R	S
SC283 ¹	S	S	S	S	S	S	S	S	S

¹ Linhagem de sorgo utilizada como padrão de suscetibilidade a *P. sorghi*.

Referências

BARBOSA, F. C. R.; PFENNING, L. H.; CASELA, C. R. *Peronosclerospora sorghi*, o agente etiológico do míldio do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 119-132, 2006.

BOCK, C. H.; JEGER, M. J.; BOSQUE-PEREZ, N. Host range of sorghum downy mildew in Africa. **International Sorghum and Millets Newsletter**, v. 37, p. 56-58, 1996.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **O míldio do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 12).

FERNANDES, N. G.; FREDERIKSEN, R. A.; PENA, A. M. Avaliação da resistência ao míldio (*Peronosclerospora sorghi* (Weston & Uppal) C. G. Shaw através da leitura de lesões foliares locais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 10, p. 189-205, 1984

FREDERIKSEN, R.A. Sorghum downy mildew in the United States: overview and out look. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, p. 903-908, 1980.

SINGH, S. D.; GOPINATH, R. A seedling inoculation technique for detecting downy mildew resistance in pearl millet. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 582-584, 1985.

JEGER, M. J.; GILIJAMSE, E.; BOCK, C. H.; FRINKING, H. D. The epidemiology, variability and control of the downy mildews of pearl millet and sorghum, with particular reference to Africa. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, p. 544-569, 1998.

PERUMAL, R.; ISAKEIT, T.; MENZ, M.; KATILE, S.; NO, E.G.; MAGILL, C. W. Characterization and genetic distance analysis of isolates of *Peronosclerospora sorghi* using AFLP fingerprinting. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 471-478, 2006.

PINTO, N. F. J. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **Controle químico do míldio (*Peronosclerospora sorghi*) em sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 51).

Circular Técnica, 169

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2011): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

Expediente

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.